Nachweis intravenös injizierter Tumorzellen des Walker-Carcinosarkoms im Blut und in den Organen von Ratten

Eckart Köhne

1962

AUS DER I. FRAUENKLINIK UND HEBAMMENSCHULE
DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. W. Bickenbach

Nachweis intravenös injizierter Tumorzellen des Walker-Carcinosarkoms im Blut und in den Organen von Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eckart Köhne
aus Kamen/Westf.

München 1962

A. Schubert, München 5, Cornelliusstr. 21 · Telefon 221777

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Professor Dr. W. BICKENBACH
Mitberichterstatter:	Professor Dr. G.K. DÖRING
Dekan:	Professor Dr. W. SEITZ

Tag der mündlichen Prüfung: 9.1.1962

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

GLIEDERUNG

Seite

A) EINLEITUNG
Vorbemerkung und Problemstellung 5

B) LITERATUR 5

I) Nachweis von Tumorzellen im Blut 5
a) biologischer und cytologischer Nachweis im Tierversuch 5
b) cytologischer Nachweis beim Menschen 6

II) Nachweis von Tumorzellen in Organen 6

C) METHODIK 6

I) Aszitesform des Walker-Carcinosarkoms und Bestimmung der Tumorzellzahl im Aszites 6

II) Intravenöse Injektion des Aszites 7

III) Blutentnahmen 8

IV) Isolierung der Tumorzellen aus dem Blut 8

D) VERSUCHE UND ERGEBNISSE 9

I) Quantitative intravenöse Verimpfung von Tumorzellen und Versuch einer gleichzeitigen cytostatischen Behandlung 9
a) Quantitative intravenöse Verimpfung von 2×10^5 und 2×10^7 Tumorzellen 9
b) Intravenöse Verimpfung von 2×10^7 Tumorzellen und gleichzeitige cytostatische Behandlung mit "Trenimon" 9
c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse 10

II) Organverpflanzungen nach vorhergehender intravenöser Verimpfung von 2×10^5 Tumorzellen 11
a) Vorbemerkung 11
b) Ergebnisse 11
c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse 12

III) Cytologischer Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut ..
a) Auswertung der "Filterpräparate" 13
b) Ergebnisse 15
c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse 18

E) ZUSAMMENFASSUNG 19

F) LITERATURVERZEICHNIS 20

A) EINLEITUNG
Vorbemerkung und Problemstellung

Eine Verschleppung von Zellen eines Tumors mit dem Blutstrom kann zu hämatogenen Metastasen führen. Der Abtransport der Tumorzellen vom Primärtumor erfolgt meistens auf venösem Weg. Mit der intravenösen Injektion von Tumorzellen wurde versucht, die hämatogene Metastasierung von Carcinomen experimentell nachzuahmen.

Es erhebt sich die Frage, was mit den injizierten Zellen geschieht. In der vorliegenden Arbeit sollte vor allen Dingen geklärt werden, ob die Tumorzellen sofort in den Organen - besonders im "Lungenfilter" - abgefangen werden oder weiter im Blut kreisen. Die Bearbeitung dieses Problems setzt den Nachweis der Tumorzellen im Blut voraus. Mit cytologischen Methoden wurden im Blut Tumorzellen gesucht und zur weiteren Nachforschung, was mit den Zellen geschieht, verschiedene Organe in die Untersuchungen einbezogen.

Die Tierexperimente erfolgten mit dem Walker-Carcinosarkom der Ratte.

B) LITERATUR

I) NACHWEIS VON TUMORZELLEN IM BLUT

a) biologischer und cytologischer Nachweis im Tierversuch

Der cytologische Nachweis von Geschwulstzellen im Blut bei experimentellen Tiertumoren ist bisher in der Literatur wenig beschrieben. Das liegt wohl in erster Linie an den methodischen Schwierigkeiten der Isolierung der Tumorzellen aus dem Blut.

Angeregt durch die positiven Versuche von BLUMENTHAL (2) bei der Erzeugung von Tumoren mit dem Blut von Tumortieren, untersuchte JONESCU (9) 1930 das Blut von Mäusen des Mäusesarkomstamms S_{37}. Er hatte durch Herzpunktion gewonnenes Na-Citrat-Blut zentrifugiert, zur Lösung der Erythrozyten mit Essigsäure behandelt und einfache Abstrichpräparate angefertigt. Dabei fand er in unterschiedlicher Zahl "atypische Zellen", die er für Krebszellen ansah.

1958 wies OLGA JONASSON (8) Krebszellen im Blut von Ratten und Mäusen mit subcutan (s.c.) wachsenden Impftumoren nach. Beim s.c. wachsenden Walker-Carcinosarkom fand sie nach der Methode von ROBERTS u. MITARBEITERN (15) bei 3 von 9 Tieren geringe Tumorzellzahlen (3-4 Tumorzellen) in jeweils 9 ml Blut. Ausserdem gelang es ihr, mit aus dem Blut isolierten Tumorzellen neue Geschwülste zu erzeugen.

Aus einem Vortrag von DOMAGK (5) aus dem Jahr 1959 ist zu entnehmen, dass DOMAGK bei einigen intramuskulär mit dem Yoshida-Sarkom geimpften Ratten im einfachen Blutausstrich Tumorzellen sah.

Untersuchungen über das cytologische Wiederauffinden von intravenös injizierten Tumorzellen sind bisher nicht veröffentlicht worden.

b) cytologischer Nachweis beim Menschen

Den vereinzelten Berichten über den cytologischen Nachweis von Geschwulstzellen im Tierexperiment steht eine etwas grössere Zahl beim Menschen gegenüber.

Unter Berücksichtigung einiger im Schrifttum veröffentlichter Untersuchungen (POOL u. DUNLOP (14), ENGELL (6), SANDBERG u. MOORE (16), ROBERTS u. MITARB. (15), SEAL (19)) entwickelten SOOST u. MAD (20) 1960 eine Methode, die einen weitgehend quantitativen Nachweis der Tumorzellen gestattet.

In dieser Arbeit wurde die Methode von SOOST u. MAD (20) in vereinfachter Form für den tierexperimentellen Tumorzellen-Nachweis übernommen.

II) NACHWEIS VON TUMORZELLEN IN ORGANEN

Schon in der älteren Literatur sind Angaben über die vereinzelt gelungene Übertragung eines Tumors auf andere Tiere mittels normalerweise metastasenfreier Organe zu finden (BLUMENTHAL, AULER u. SOLECKA (1); GROSS (7); COLLIER (3)).

Im Rahmen dieser Arbeit interessieren besonders die Untersuchungen von SCHMÄHL u. RIESEBERG (18) mit dem Walker-Carcinosarkom. Sie überimpften 5, 60 und 120 Minuten nach der intravenösen Injektion von tumorzellhaltigem Aszites Blut und die stets metastasenfreien Organe Niere und Leber auf neue Ratten. Tumorangang ergab sich: bei Blut zu allen 3 Zeiten, bei der Niere nach 5 und 60 Minuten, bei der Leber nur nach 5 Minuten. Leider fehlt eine Angabe der zum Versuch eingesetzten Tierzahl.

C) METHODIK

I) ASZITESFORM DES WALKER-CARCINOSARKOMS UND BESTIMMUNG DER TUMORZELLZAHL IM ASZITES

Für die Versuche wurden insgesamt 224 erwachsene, weisse weibliche Ratten, vom Stamm Wistar benötigt, die eine Mischkost aus Küchenabfällen erhielten. Gewicht der Tiere: ca. 200 g.

Nach dem Tod der zum Versuch eingesetzten Ratten erfolgte eine gründliche

Sektion und die Protokollierung der makroskopischen Befunde. Einige histologische Schnitte ergänzten und bestätigten die Befunde.

Für die im Rahmen dieser Arbeit notwendige intravenöse Verimpfung von Tumorzellen besitzt das Arbeiten mit Tumor-ASZITES nach Empfehlungen von SCHMÄHL u. RIESEBERG (18) sowie KARRER (10) grosse Vorteile gegenüber den Tumorbrei-Suspensionen, wie sie von SUGARBAKER (22), COMAN (4), WATANABE (23) angegeben wird. Neben der Zeitersparnis durch den Fortfall des Zerkleinerungsvorgangs ist die Auszählung der Zellen in der Leukozytenzählkammer wesentlich erleichtert. Ausserdem sind bei der Verimpfung von Tumorbrei Lungeninfarkte und Pneumonien beschrieben worden (KARRER (10)). Das subcutan auf dem Rücken wachsende Walker-Carcinosarkom der Ratte wurde daher für diese Arbeit nach mehreren subcutanen Passagen in die Aszitesform überführt. TECHNIK: Mechanische Zerkleinerung der etwa walnussgrossen Tumoren unter sterilen Bedingungen. Danach wurden je 0,5 ccm des mit NaCl-Lösung im Verhältnis 1 : 1 versetzten Tumorbreis intraperitoneal auf neue Ratten verimpft. Im Bauchraum dieser Tiere entwickelte sich ein typisch wachsendes Walker-Carcinosarkom mit Bildung von tumorzellhaltigem Aszites. Angangsrate: ca. 90 %. Zum Vergleich: Angangsrate bei subcutan geimpften Ratten: ebenfalls 90 %. Diese hohen Angangsraten über mehrere Passagen sanken plötzlich trotz gleichbleibender Technik soweit ab, dass lediglich der Tumorstamm erhalten werden konnte. Da unter diesen Umständen eine genügende Reproduzierbarkeit der Versuche fehlte, trat eine Pause für einen Monat ein, bis sich wieder die alten Angangsraten erzielen liessen. Den Aszites-Spendertieren wurde der Aszites - unter streng sterilen Kautelen - zwischen dem 5. - 8. Tag nach der intraperitonealen Impfung mit Tumorbrei entnommen. Die Absterbezeit dieser Ratten lag bei 12 $\pm$ 2 Tagen. Der Aszites war zum Teil hämorrhagisch, zum Teil von der Farbe des Blutserums. Die Beobachtung von WRBA (25) konnte damit bestätigt werden.

Nach Angaben von SCHMÄHL u. MECKE (17) erfolgte die Bestimmung der Zellzahl im Tumoraszites nach Art der Leukozytenzählung in einer entsprechenden Zählkammer. Um die gewünschten Zellzahlen zu erzielen, wurde der Aszites entweder verdünnt oder die injizierte Menge variiert. Als Verdünnungsflüssigkeit diente Ringerlösung mit 200 mg% Glucose. In einigen Fällen war auch eine kurze Zentrifugierung notwendig (1 Min./500 Umdrehungen).

II) INTRAVENÖSE INJEKTION DES ASZITES

Zur intravenösen Injektion des Aszites erhielt die Schwanzvene den Vorzug. In Äthernarkose wurde der vorher für 1-2 Minuten hyperämisierte Schwanz fixiert und ca. 2 cm unterhalb der Schwanzwurzel ein 1 cm langer Schnitt mit einer sterilen Rasierklinge direkt neben der Vene ausgeführt. In die nun deutlich sichtbare Vene erfolgte die Injektion des Tumoraszites (Kanüle: Nr. 20). Diese Injektions-

methode hat sich im Laufe der Versuche sehr bewährt. Beweis für die exakte intravenöse Injektion: bei keinem Tier entwickelte sich im Bereich der Injektionsstelle ein lokaler Tumor, wie es bei paravenöser Einspritzung typisch ist und in orientierenden Vorversuchen an 3 Ratten ausprobiert wurde.

III) BLUTENTNAHMEN

Da bei jedem Tier in bestimmten Zeitabständen insgesamt viermal Blut entnommen werden sollte, schieden einige Methoden der Blutentnahme von vornherein aus (Herzpunktion, Eröffnung der Aorta, Entblutung). Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen erwies sich die SCHWANZKUPIERUNG, die z.B. auch bei Blutuntersuchungen unter anderer Problemstellung durchgeführt wurde (KÜHL (11)), als geeignetste Methode. Die Blutstillung erfolgte durch eine Ligatur mit Catgut.

IV) ISOLIERUNG DER TUMORZELLEN AUS DEM BLUT

Der methodische Ablauf der Blutentnahmen und der Isolierung der Tumorzellen aus dem Blut nach der modifizierten Methode von SOOST u. MAD (20) ergibt folgende zeitliche Reihenfolge:

1) Entnahme von jeweils 0,3 ml Blut aus den Schwanzgefässen der Ratte mittels Schwanzkupierung nach vorhergehender Hyperämisierung.
2) Auffangen des Blutes in einem Uhrglas und Aufziehen in einer Tuberkulin-Spritze mit Natr. citr. 3,8 %ig im Verhältnis 5 : 1.
3) Eliminierung der Erythrozyten durch Hämolyse mit ca. 10 Tropfen Saponin (0,1 %).
4) Nach erfolgter Hämolyse Zentrifugierung für 5 Minuten bei 500 Umdrehungen/Minute.
5) Absaugen des Überstands und Aufschwemmung des Sediments mit NaCl-Lösung. Es schloss sich an:
6) Filtrierung des Blutes mit dem Filtergerät B 5 der Membranfiltergesellschaft Göttingen.
7) Auffangen der Zellen auf je 1 Cella-Filter "grob". Durchmesser der Filter: 55 mm, maximale Porenweite: unter 1 Mikron.
8) Fixierung in Äther-Alkohol āā 96 %ig für 10 Minuten.
9) Färbung der Filter nach PAPANICOLAOU.
10) Aufbringen der beidseitig mit Kanadabalsam versehenen Filter auf grosse Objektträger (7,5 x 5,5 cm) und Abschluss durch ein Deckglas.

Die so entstandenen "FILTERPRÄPARATE" konnten nach Trocknen des Kanadabalsams mikroskopisch ausgewertet werden.

Die benötigten Zentrifugengläser, Spritzen, Pipetten, Uhrgläser waren sämtlich silikonisiert.

Trotz der zeitraubenden Verarbeitung des Blutes und der ca. 2 Stunden pro Filter währenden Durchmusterung unter dem Mikroskop erhielt das oben angegebene Verfahren den Vorzug vor den einfachen Objektträger-Ausstrichen, da die Ergebnisse der "Filterpräparate" quantitativ miteinander verglichen werden können. Ausserdem ist es möglich, grössere Blutmengen zu untersuchen.

D) VERSUCHE UND ERGEBNISSE

I) QUANTITATIVE INTRAVENÖSE VERIMPFUNG VON TUMORZELLEN UND VERSUCH EINER GLEICHZEITIGEN CYTOSTATISCHEN BEHANDLUNG

a) Quantitative intravenöse Verimpfung von 2×10^5 und 2×10^7 Tumorzellen

Zur Feststellung der zum Angang einer hämatogen induzierten Geschwulst nötigen ZELLZAHL wurde zunächst Tumoraszites mit bestimmter Zellzahl in die Schwanzvene der Ratten injiziert.

1. Gruppe:
6 Tiere, intravenöse Injektion von je 2×10^5 Tumorzellen. Tötung der Tiere nach einer Beobachtungszeit von 2 Monaten. Die Sektion ergab keinen tumorverdächtigen Befund.

2. Gruppe:
12 Tiere, intravenöse Injektion von je 2×10^7 Tumorzellen. 9 Tiere starben an Lungenmetastasen. Absterbezeit: 17 ± 6 Tage. 3 Tiere ohne Tumorangang.

Die Sektion der 9 gestorbenen Ratten zeigte folgenden Befund: die Lungen waren fast gleichmässig mit weissen Knötchen bedeckt. Grösse der Knötchen: stecknadelkopf- bis erbsengross. Bei 2 Ratten war die Lunge teilweise in eine tumoröse Masse von fester Konsistenz umgewandelt, bei 2 anderen Ratten wurde ein blutiges Pleuraexsudat festgestellt. Die übrigen Organe zeigten keine Veränderungen.

b) Intravenöse Verimpfung von 2×10^7 Tumorzellen und gleichzeitige cytostatische Behandlung mit "TRENIMON"

In einer 3. Gruppe erfolgte eine gleichzeitige cytostatische Behandlung mit "TRENIMON" (Bayer 3231).

Voraus gingen TOXIZITÄTSPRÜFUNGEN an 6 Tieren mit einer Gesamtdosis von 0,3 mg Trenimon/kg, verteilt auf 6 Behandlungen, jeweils subcutan gegeben. Ergebnis: alle 6 Ratten ertrugen diese Dosis trotz eines Gewichtsabfalls von ca.

30 %. Die Gesamtdosis von 0,3 mg/kg konnte jedoch für die Versuche nicht beibehalten werden. 9 Tiere, denen zuvor je 2 x 10^7 Tumorzellen intravenös injiziert worden waren, starben zum Teil noch während der cytostatischen Behandlung an Intoxikationserscheinungen.

Diese Tatsache überraschte, da bei zeitlich gleichzeitig laufenden Versuchen mit dem intravenös verimpften Aszites des Yoshida-Sarkoms der Ratte (MARQUARDT (12)) die Gesamtdosis von 0,3 mg Trenimon/kg besser vertragen wurde. Möglicherweise handelt es sich um eine spezifisch beim Walker-Carcinosarkom ungünstige Wirkung des Trenimons.

Die Gesamtdosis wurde nun auf 0,225 mg Trenimon/kg reduziert, verteilt auf 12 Behandlungen (2 Vor- und 10 Nachbehandlungen), jeweils subcutan gegeben.

3. Gruppe:
Intravenöse Injektion von je 2 x 10^7 Tumorzellen an 12 Ratten und gleichzeitige cytostatische Behandlung mit "Trenimon".
1 Tier starb an Lungenmetastasen, Absterbezeit: 20 Tage.
2 Tiere starben unter Intoxikationserscheinungen am 8. und 9. Tag der cytostatischen Behandlung.
9 Tiere überlebten.

c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der 3 Gruppen sind in der Tabelle 1 zusammengestellt.

TABELLE 1: Ergebnisse der quantitativen intravenösen Verimpfung von Tumoraszites des Walker-Carcinosarkoms und Beeinflussung durch cytostatische Behandlung mit "TRENIMON".

	1. Gruppe	2. Gruppe	3. Gruppe
Intravenös verimpfte Zellzahl	2 x 10^5 Zellen	2 x 10^7 Zellen	2 x 10^7 Zellen
Anzahl der Tiere	6 Tiere	12 Tiere	12 Tiere$^+$
Cytostatische Behandlung	----	----	ja
Tumor-Angang	----	9 Tiere	1 Tier
Befallenes Organ	----	Lunge	Lunge

$^+$2 Tiere starben unter Intoxikationserscheinungen.

Die Ergebnisse zeigen:

1) Bei einer intravenösen Verimpfung von 2 x 10^5 Tumorzellen entstand kein Tumor.
2) Erst bei der intravenösen Verimpfung von 2 x 10^7 Tumorzellen entwickelte sich bei 9 von 12 Ratten ein Tumor. Befallen war nur die Lunge, die anderen Organe

wiesen keine Geschwulst auf. Die Angaben von SCHMÄHL u. RIESEBERG (18) konnten damit bestätigt werden.

3) Bei einer gleichzeitigen cytostatischen Behandlung mit "TRENIMON" starb nur 1 Tier an Lungenmetastasen.

II) ORGANVERPFLANZUNGEN NACH VORHERGEHENDER INTRAVENÖSER VERIMPFUNG VON 2 x 10^5 TUMORZELLEN

a) Vorbemerkung

Nachdem es sich herausgestellt hatte, dass nach der intravenösen Verimpfung von 2 x 10^5 Tumorzellen keine Tumoren entstanden, sollte geprüft werden, ob sich trotzdem lebensfähige Tumorzellen in den Organen befanden, ohne in ihnen eine Geschwulst hervorzurufen. Zum Nachweis diente der "Organimplantationstest". Die Organe (Lunge, Niere, Leber) wurden mechanisch im Handmörser zerkleinert und die Gesamtmenge eines Organs auf je ein neues Tier intraperitoneal überimpft. Kanüle: Nr. 1. Einige Ratten erhielten wieder gleichzeitig eine cytostatische Behandlung mit "TRENIMON".

b) Ergebnisse

4. Gruppe:
Intravenöse Injektion von je 2 x 10^5 Tumorzellen an 13 Tiere. Tötung der Tiere 12 Tage später. Bei allen Ratten war kein makroskopischer Befund an den Organen festzustellen. Verimpfung der Organe Lunge, Niere, Leber als Organbrei intraperitoneal auf neue Ratten.

5. Gruppe:
Intravenöse Injektion von je 2 x 10^5 Tumorzellen an 13 Tiere und gleichzeitige cytostatische Behandlung mit "TRENIMON". Gesamtdosis: 0,225 mg/kg. Tötung der Tiere nach 12 Tagen und Verimpfung der Organe wie bei der 4. Gruppe.

Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengestellt.

TABELLE 2: Intraperitoneale Organbreiverimpfungen von Tieren, denen 12 Tage vorher 2 x 10^5 Tumorzellen intravenös injiziert worden waren. Keine cytostatische Behandlung.

Verimpftes Organ	Anzahl der Tiere	Tumorangang
Lunge	13 Tiere	10 Tiere
Niere	13 Tiere	7 Tiere
Leber	6 Tiere	2 Tiere

TABELLE 3: Intraperitoneale Organbreiverimpfungen von Tieren, denen 12 Tage vorher 2 x 10^5 Tumorzellen intravenös injiziert worden waren. Gleichzeitige cytostatische Behandlung der "Organspendertiere" mit "TRENIMON".

Verimpftes Organ	Anzahl der Tiere	Tumorangang
Lunge	13 Tiere[+]	2 Tiere
Niere	11 Tiere[+]	0

[+]Unter Intoxikationserscheinungen starben 2 Tiere, denen Lungenbrei und 2 Tiere, denen Nierenbrei intraperitoneal verimpft worden war.

Die Sektion der Tiere mit einem Angang des Tumors ergab ein typisch wachsendes Walker-Carcinosarkom in der Bauchhöhle mit Aszitesbildung. Kontrollabstriche des Aszites enthielten stets Tumorzellen.

c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Organverpflanzungen zeigen:

1) Tumorzellen, die in einem Organ dank dessen Abwehrkräften keine Geschwulst hervorriefen (Lunge), können bei einem "Milieuwechsel" (Übertragung des Organs auf andere Tiere) zu einem Tumorangang führen.

2) Es gelingt auch, neue Tumoren zu erzeugen mit Organen, die stets frei von Metastasen bleiben (Niere, Leber); auch in diese Organe müssen also lebensfähige Krebszellen gelangt sein.

3) Eine cytostatische Behandlung der "Organspendertiere" mit "TRENIMON" scheint die Tumorzellen so geschädigt zu haben, dass nur in wenigen Fällen neue Geschwülste entstehen.

Wie eingangs im Literatur-Kapitel erwähnt, gelang es SCHMÄHL und RIESEBERG (18), bei der Verimpfung von Nierenbrei nur 5 und 60 Minuten nach der intravenösen Impfung mit Walker-Aszites einen Tumorangang zu erzielen (nach 120 Minuten negativ), bei der Verimpfung von Leberbrei sogar nur nach 5 Minuten (nach 60 und 120 Minuten negativ). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beweisen, dass auch noch 12 Tage nach der intravenösen Tumorzellen-Injektion lebensfähige Tumorzellen in der Niere und Leber vorhanden waren. Die Annahme, dass die Zellen nicht mit den injizierten identisch sind, sondern aus inzwischen gebildeten metastatischen Herden stammen, ist zwar theoretisch auch denkbar, aber wohl unwahrscheinlich.

III) CYTOLOGISCHER NACHWEIS VON TUMORZELLEN IM STRÖMENDEN BLUT

a) Auswertung der "Filterpräparate"

Zur Feststellung, ob die injizierten Tumorzellen sofort in der Lunge[+] abgefangen werden oder weiter im Blut kreisen und nachweisbar sind, wurde den Tieren 4, 20 und 80 Minuten nach der intravenösen Injektion von Tumor-Aszites jeweils 0,3 ml Blut abgenommen und cytologisch auf Tumorzellen untersucht. Am 12. Tag folgte eine 4. Blutentnahme.

Die Technik der Blutentnahme und der Aufarbeitung des Blutes ist im Kapitel Methodik (Seite 7-9) ausführlich beschrieben.

Bevor die angefertigten "Filterpräparate" mikroskopisch ausgewertet werden konnten, waren genaue Kenntnisse der Morphologie der Tumorzelle notwendig. Zur Erlangung dieser Kenntnisse dienten Direktabstriche und Tumorsaft-Abstriche des Walker-Carcinosarkoms und schliesslich "Filterpräparate" mit Tumor-Aszites. Alle Präparate waren nach Papanicolaou gefärbt worden.

Ein Vergleich von Tumor-Direktabstrichen und "Filterpräparaten" mit Tumor-Aszites zeigte keine Unterschiede der Tumorzellen. Um Verwechslungen von Tumorzellen und normalen Blutzellen auszuschliessen, wurden auch mehrere "Filterpräparate" mit Blut durchgesehen.

Bei der mikroskopischen Auswertung der "Filterpräparate" sieht man die Zellen ziemlich gleichmässig verteilt. Die Präparate enthalten keine Erythrozyten (Hämolyse).

Die Tumorzellen sind im allgemeinen deutlich grösser als die Leukozyten, es gibt nur selten Ausnahmen. Auf Grund des unterschiedlichen färberischen Verhaltens und der typischen Form der Kerne und Nucleoli lässt sich die Entscheidung, ob es sich um eine Tumorzelle handelt oder nicht, mit 1200facher Vergrösserung (Okular: 12x, Objektiv: 100x, Ölimmersion) fast immer fällen. In fraglichen Fällen half ein Vergleich mit Tumor-Aszites-Präparaten weiter.

Die Durchsicht der Präparate erfolgte zuerst mit 300facher Vergrösserung (Okular: 12x, Objektiv: 25x), nach wochenlanger Übung mit 120facher Vergrösserung (Ok.: 12x, Obj.: 10x). Jede verdächtige Zelle wurde mit der Ölimmersion beurteilt und bei Bestätigung mit einem Tuschefleck auf dem Deckglas versehen, der die spätere Wiederauffindung mühelos gestattete.

Einen Eindruck über das Aussehen der gefundenden Tumorzellen vermittelt die Abbildung 2. Sie zeigt Tumorzellen, die 4 Minuten nach der intravenösen Injektion von 2×10^5 Tumorzellen im peripheren Blut einer Ratte gefunden wurden. Zum Vergleich zeigt Abbildung 1 einen einfachen Objektträger-Ausstrich einer Tumorbrei-Suspension des Walker-Carcinosarkoms.

[+] oder anderen Organen

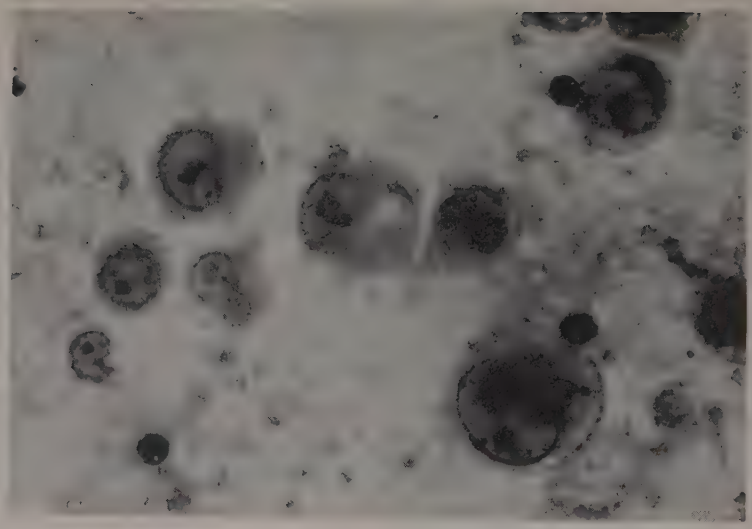

ABBILDUNG 1: Tumorzellen einer Tumorbrei-Suspension des Walker-Carcinosarkoms im einfach Objektträger-Ausstrich. Vergrösserung: 800 fach (Ok. : 8x; Obj. : 100x, Öl).

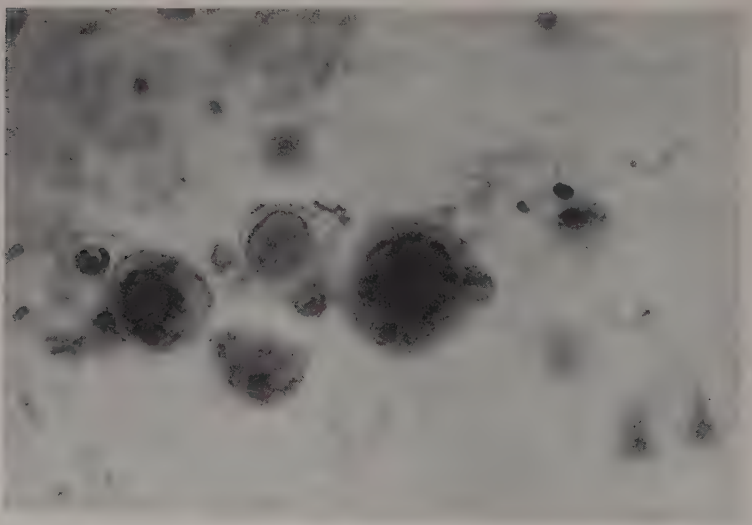

ABBILDUNG 2: Tumorzellen des Walker-Carcinosarkoms in einem "Filterpräparat". Aus dem peripheren Blut einer Ratte, die 4 Min. vorher mit 2×10^5 Tumorzellen intravenös geimpft worden war. Vergrösserung: 800 fach (Ok. : 8x, Obj. : 100x, Öl).

Es sei noch erwähnt, dass in 3 Präparaten, in denen die normalen Blutzellen durch den Verarbeitungsvorgang stark geschädigt waren, - was sich leider in einigen Fällen nicht vermeiden liess - die Tumorzellen völlig unversehrt waren. Die Tumorzellen scheinen also gegenüber Artefakten wesentlich widerstandsfähiger zu sein als die normalen Blutzellen.

b) Ergebnisse

Es gelangten insgesamt 136 "Filterpräparate" von 34 Tieren zur Auswertung. Von den 34 Tieren waren 12 Tiere mit je 2×10^5 und 22 Tiere mit je 2×10^7 Tumorzellen intravenös geimpft worden.

Ein Vergleich von unbehandelten gegenüber cytostatisch behandelten Tieren erübrigt sich für die Präparate 4, 20 und 80 Minuten nach der Injektion, da keine Unterschiede feststellbar sind.

Die Tumorzellen lagen in den Präparaten teils einzeln, teils in grösseren Gruppen. In 12 Präparaten konnten Zusammenlagerungen von 10 - 20 Tumorzellen beobachtet werden. In einem Präparat fand sich ein Tumorzellgerinnsel von ca. 220 Zellen.

Zusammenstellung der ausgewerteten Präparate in den Tabellen 4 und 5.

TABELLE 4: Intravenöse Injektion von je 2×10^5 Tumorzellen. Gefundene Tumorzellen im Blut.

Tier Nr.	nach 4 Min.	nach 20 Min.	nach 80 Min.
1	4 Zellen	2 Zellen	1 Zelle
2	2 "	2 "	0
3	6 "	3 "	6 Zellen
4	7 "	5 "	3 "
5	24 "	24 "	4 "
6	23 "	3 "	4 "
7	44 "	16 "	3 "
8	21 "	3 "	1 "
9	14 "	9 "	11 "
10	5 "	6 "	1 "
11	18 "	21 "	2 "
12	8 "	7 "	2 "
	176 Zellen	101 Zellen	38 Zellen

TABELLE 5: Intravenöse Injektion von je 2 x 10^7 Tumorzellen. Gefundene Tumorzellen im Blut.

Tier Nr.	nach 4 Min.	nach 20 Min.	nach 80 Min.
1	96 Zellen	94 Zellen	72 Zellen
2	3 "	2 "	1 Zelle
3	5 "	3 "	11 Zellen
4	3 "	4 "	3 "
5	7 "	0 "	2 "
6	18 "	4 "	2 "
7	2 "	1 Zelle	0 "
8	29 "	18 Zellen	10 "
9	38 "	8 "	5 "
10	5 "	25 "	3 "
11	40 "	17 "	8 "
12	109 "	55 "	45 "
13	3 "	3 "	5 "
14	2 "	2 "	6 "
15	3 "	1 "	2 "
16	33 "	22 "	35 "
17	54 "	129 "	33 "
18	3 "	1 "	3 "
19	3 "	1 "	6 "
20	52 "	65 "	26 "
21	235 "	6 "	2 "
22	27 "	27 "	20 "
	770 Zellen	488 Zellen	300 Zellen

Im Gegensatz zu den Ergebnissen 4, 20, 80 Minuten nach der Tumorzellen-Injektion ist bei den Blutentnahmen nach 12 Tagen eine Unterteilung in cytostatisch behandelte und unbehandelte Tiere notwendig, da sich deutliche Unterschiede ergaben.

Bei 19 unbehandelten Tieren wiesen 8 Filter Tumorzellen auf, während bei 15 cytostatisch behandelten Ratten nur 1 Filter Tumorzellen-positiv war (3 Tumorzellen).

TABELLE 6: Blutentnahmen 12 Tage nach der intravenösen Injektion der Tumorzellen.

	Anzahl der Tiere	Anzahl der "Filterpräparate" mit Tumorzellen
unbehandelt	19	8
cytostatisch behandelt	15	1

Dieser Befund, der auch den klinischen Ergebnissen entspricht (Seite 10, Tabelle 1 und Seite 11 und 12, Tabellen 2 und 3), dürfte in erster Linie auf die cytostatische Behandlung mit "TRENIMON" zurückzuführen sein.

Nur bei 3 von 10 Tieren, die an Lungenmetastasen zugrunde gingen, konnten 12 Tage nach der intravenösen Injektion Tumorzellen im Blut gefunden werden (siehe Tabelle 7), während 1 andere Ratte trotz nachgewiesener Tumorzellen im Blut nicht starb.

TABELLE 7: Blutentnahmen 12 Tage nach der intravenösen Injektion von 2×10^7 Tumorzellen, wenige Tage vor dem Tod der Tiere an Lungenmetastasen.

Tier Nr.	Gefundene Tumorzellen im Blut
1	4 Zellen
2	0 "
3	0 "
4	0 "
5	2 "
6	32 "
7	0 "
8	0 "
9	0 "
10+	0 "

+Tier Nr. 10 war cytostatisch behandelt worden.

Die Organe von 3 Ratten mit negativem Tumorzellbefund im Blut riefen nach der Organbreiüberimpfung (Seite 11, Tabelle 2) neue Geschwülste hervor; andererseits erzeugten die Organe von 1 Tier keinen neuen Tumor, obwohl 110 Tumorzellen im Blut gefunden wurden.

c) Zusammenstellung und Besprechung der Ergebnisse

Die Ergebnisse sagen folgendes aus:

1) Im Blut von fast allen Ratten, denen intravenös Tumorzellen injiziert worden waren, wurden 4, 20 und 80 Minuten später Tumorzellen wieder nachgewiesen, so dass man fast von einem "Spiegel" der Tumorzellen im Blut sprechen könnte.
2) Durchschnittlich die meisten Tumorzellen enthielten die Präparate 4 Minuten nach der Injektion, durchschnittlich die wenigsten die Präparate nach 80 Minuten.
3) Tiere mit 2×10^5 intravenös injizierten Tumorzellen wiesen zu allen Zeiten deutlich weniger Tumorzellen im Blut auf als Tiere mit 2×10^7 intravenös injizierten Zellen.
4) 12 Tage nach der intravenösen Injektion von Tumoraszites wurden in weitaus weniger Fällen Tumorzellen im Blut gefunden als bei den Blutuntersuchungen nach 4, 20 und 80 Minuten.
5) Von 15 mit dem Cytostatikum "TRENIMON" behandelten Tieren hatte nach 12 Tagen nur 1 Tier einen positiven Tumorzellenbefund im Blut, während bei 19 unbehandelten Tieren in 8 Fällen Tumorzellen gefunden wurden.

Die cytologischen Ergebnisse erlauben die Feststellung, dass die im Blut gefundenen Tumorzellen das "Lungenfilter" vielfach passiert haben müssen. Das spricht gegen eine rein mechanische Begründung der Tatsache, dass beim Walker-Carcinosarkom nur Lungenmetastasen auftreten.

Zum Vergleich seien noch die cytologischen Untersuchungen unter derselben Fragestellung beim Yoshida-Sarkom der Ratte herangezogen (MARQUARDT (12)). Das Yoshida-Sarkom metastasiert regelmässig in mehrere Organe (Niere, Nebenniere, Lunge, Herz, Mesenterien u.a.). Es wurden zwar durchschnittlich mehr Tumorzellen im Blut gefunden als beim Walker-Carcinosarkom, doch sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar, die die verschiedene Metastasierung der beiden Tumoren erklären könnten. Auch eine unterschiedliche Zellgrösse scheidet als Begründung aus, wie Messungen des Zelldurchmessers bewiesen (SCHMÄHL u. RIESEBERG (18)).

Da die Tumorzellbefunde im Blut zum Teil erheblich von den klinischen Ergebnissen abwichen, können aus den Blutbefunden wohl kaum prognostische Schlüsse gezogen werden. Es überraschten besonders die cytologischen Auswertungen bei den Ratten, die an ausgedehnten Lungenmetastasen zugrunde gingen. Nur bei einigen konnten wenige Tage vor dem Tod Tumorzellen im Blut nachgewiesen werden. Wie weit sich diese Befunde zu den Carcinomen und Metastasen der Humanpathologie in Beziehung setzen lassen, ist schwer zu entscheiden. Die im Tierversuch gewonnenen Ergebnisse bestätigen jedenfalls die Beobachtungen bei menschlichen Krebskranken, dass auch bei fortgeschrittenen Carcinomen durchaus nicht regelmässig Krebszellen im Blut nachzuweisen sind (ENGELL (6); SANDBERG u. MOORE (16); MOORE, SANDBERG u. SCHUBARG (13); ROBERTS u. MITARB. (15); WHANG (24); SOOST (21)).

E) ZUSAMMENFASSUNG

1) Mit dem Walker-Aszites-Carcinosarkom wurden tierexperimentelle Untersuchungen an 224 Ratten durchgeführt.
2) Die Ergebnisse von SCHMÄHL u. RIESEBERG (18) konnten bestätigt werden, dass erst die intravenöse Verimpfung von 2×10^7 Tumorzellen eine Geschwulst hervorruft und nur die Lunge befallen ist.
3) Nach der intravenösen Injektion von 2×10^5 Tumorzellen traten keine Tumoren auf. 12 Tage später vorgenommene Organverpflanzungen bewiesen, dass sich nicht nur in der Lunge, sondern auch in anderen Organen (Niere und Leber) lebensfähige Krebszellen befanden, ohne in denselben einen Geschwulstangang zu bewirken.
4) Eine cytostatische Behandlung der Ratten mit "TRENIMON" zeigte sich wirksam. Das konnte belegt werden:
   a) durch die Beobachtung der Überlebenszeit,
   b) durch Organverpflanzungen,
   c) durch den cytologischen Nachweis von Tumorzellen im Blut.
5) Im Mittelpunkt der Arbeit stand der cytologische Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut. Es war möglich, intravenös injizierte Carcinomzellen 4, 20 und 80 Minuten nach der Injektion regelmässig im Blut wieder nachzuweisen. Diese Tatsache spricht ebenso wie der Tumorzellen-Nachweis in der Niere und Leber gegen eine rein mechanische Begründung für die ausschliesslich auftretenden Lungenmetastasen des Walker-Carcinosarkoms. Die mit dem Blutstrom zirkulierenden Tumorzellen hatten offensichtlich das "Lungenfilter" überwunden.
6) Die Tumorzellbefunde im Blut 12 Tage nach der intravenösen Tumorzellen-Injektion liessen keine prognostischen Schlüsse auf die Überlebenszeit der Tiere zu, da sie nur teilweise mit dem klinischen Verlauf übereinstimmten. Ratten, die an ausgedehnten Lungenmetastasen starben, wiesen wenige Tage vor ihrem Tod nur in einigen Fällen nachweisbar Tumorzellen im Blut auf.
7) Als interessanter Nebenbefund wurde eine grosse Unempfindlichkeit der Tumorzellen gegenüber den Bearbeitungsmethoden beobachtet.

F) LITERATURVERZEICHNIS

(1) BLUMENTHAL, F., H. AULER u. F. SOLECKA: Erzeugung neuartiger Tumoren durch Milzbrei eines Rattensarkoms. Zschr. Krebsforsch. 25, 229-234 (1927).

(2) BLUMENTHAL, F.: Über die Erzeugung von Tumoren mit Blut von Tumortieren. Zschr. Krebsforsch. 29, 549-553 (1929).

(3) COLLIER, W. A.: Über den Nachweis des Agens des Ehrlichschen Aszitescarcinoms in den Organen der Maus. Zschr. Krebsforsch. 41, 303-307 (1934).

(4) COMAN, D. R.: Mechanism responsible for the origin and distribution of blood-borne tumor metastases. A Review. Cancer Res. 13, 397 (1954).

(5) DOMAGK, G.: Experimentelle Grundlagen chemotherapeutischer Rezidivprophylaxen. Vortrag auf der 7. Österreichischen Krebstagung in Salzburg am 14./15. 5. 1959.

(6) ENGELL, H.C.: Cancer cells in the circulating blood. Acta chir. scand. (Suppl. 201) 1950.

(7) GROSS, L.: Über die Zeitgrenzen der Übertragungsfähigkeit eines Impfsarkoms mittels des Blutes und der tumorfreien Organe der Maus. Zschr. Krebsforsch. 38, 241-248 (1932).

(8) JONASSON, O.: The viability of circulating cancer cells in experimental cancer. Surg. Forum 9, 577-580 (1958).

(9) JONESCU, P.: Über das Vorkommen von Geschwulstzellen im strömenden Blut von Tieren mit Impftumoren. Zschr. Krebsforsch. 33, 264-280 (1930).

(10) KARRER, K.: Ergebnisse der intravenösen Implantation von Impftumoren. Wien. Klin. Wschr. 69, 205-207 (1957).

(11) KÜHL, I.: Untersuchungen des Blutes von Tumormäusen. Arch. Geschwulstforsch. 9, 293-296 (1955).

(12) MARQUARDT, H.: Experimentelle Untersuchungen über den cytologischen Nachweis von Tumorzellen im strömenden Blut und in den Organen von Ratten. Inauguraldiss. der Med. Fakultät d. Univ. München (unveröffentlicht).

(13) MOORE, G. E., E. A. SANDBERG u. J. R. SCHUBARG: Clinical and experimental observations of the occurence and fate of tumor cells in the blood stream. Ann. Surg. 146, 580 (1957).

(14) POOL, E. H. u. G. R. DUNLOP: Cancer cells in the blood stream. Amer. J. Cancer 21, 99-102 (1934).

(15) ROBERTS, St., A. WATNE, R. McGRATH, E. McGREW u. W. H. COLE: Technique and results of isolation of cancer cells from the circulating blood. A. M. A. Arch. Surg. (Chicago) 76, 334-346 (1958).

(16) SANDBERG, A. A. u. G. E. MOORE: Examination of blood for tumor cells. J. Nat. Cancer Inst. 19, 1-11 (1957).

(17) SCHMÄHL, D. u. R. MECKE: Quantitative Transplantationsversuche mit dem Yoshida-Ascitessarkom der Ratte. Zschr. Krebsforsch. 60, 711-729, (1955).

(18) SCHMÄHL, D. u. Th. RIESEBERG: Experimentelle Untersuchungen über die Metastasierung von Tumoren. Zschr. Krebsforsch. 62, 456-480 (1958).
(19) SEAL, S. H.: Silicone flotation: A simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood. Cancer 12, 590 (1959).
(20) SOOST, H. J. u. H. MAD: Methoden zur Isolierung von Geschwustzellen aus dem strömenden Blut. Krebsarzt 15, 273-283 (1960).
(21) SOOST, H. J.: Vortrag auf dem Kolloquium d. Medizin. Fakultät München 20. 7. 1960.
(22) SUGARBAKER, E. D.: The organ selectivity of experimentally induced metastases in rats. Cancer, Philadelphia 5, 606 (1952).
(23) WATANABE, S.: The metastasizability of tumor cells. Cancer, Philadelphia 7, 215 (1954).
(24) WHANG, J.: Über Krebszellen im Blut und Knochenmark. Zschr. Krebsforsch. 62, 397-407 (1958).
(25) WRBA, H.: Über wechselweise auf Ratten und Mäusen wachsende Tumorlinien in Aszitesform. Klin. Wschr. 37, 773 (1959).

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. med. H. -J. SOOST bedanken. Unter seiner Anleitung erlernte ich die Beurteilung der cytologischen Präparate und sein freundliches Entgegenkommen bei der Beschaffung der Arbeitsgeräte ermöglichte die Durchführung der Tierversuche.

LEBENSLAUF

Am 8.12.1935 wurde ich, Eckart Köhne, als Sohn des praktischen Arztes Dr. med. Immo Köhne und seiner Ehefrau Gerta in Kamen/Westfalen geboren und evangelisch getauft.

Nach vier Volksschuljahren besuchte ich von Ostern 1947 bis 1956 das Städt. Neusprachliche Gymnasium in Kamen und erhielt Ostern 1956 das Reifezeugnis.

Die fünf vorklinischen Semester Medizin studierte ich in Marburg/Lahn und bestand dort im Oktober 1958 die ärztliche Vorprüfung. Das klinische Studium begann ich anschliessend mit zwei Semestern in Hamburg und setzte es im Wintersemester 1959/60 in München fort. Im September 1961 begann ich an der Universität München mit dem medizinischen Staatsexamen, welches ich im Dezember 1961 beendete.